

# 全反式视黄酸对癌细胞凋亡的诱导

吴 乔<sup>1</sup> 郑 耘<sup>1</sup> 张晓坤<sup>2</sup>

**摘 要** 目的: 探讨全反式视黄酸(ATRA)对乳腺癌细胞生长抑制和对细胞凋亡诱导的机理。方法: 采用荧光显微术、流式细胞术、MTT测定和RNA印迹等方法, 检测细胞凋亡、细胞生长和mRNA的表达水平。结果: 1) ATRA能够有效地诱导ZR-75-1乳腺癌细胞凋亡, 但不能诱导MDA-MB-231乳腺癌细胞凋亡。2) ATRA能够有效地抑制ZR-75-1细胞的生长, 但不能抑制MDA-MB-231细胞生长。3) ATRA能够诱导ZR-75-1细胞的视黄酸受体RAR $\beta$ 的表达, 但不能诱导MDA-MB-231细胞的RAR $\beta$ 表达。结论: ATRA诱导的细胞凋亡与其对ZR-75-1细胞生长抑制有关, 对MDA-MB-231细胞生长及凋亡无影响, RAR $\beta$ 的表达可能介导ATRA诱导的细胞凋亡和细胞生长抑制过程。

**主题词** 全反式视黄酸/治疗应用 细胞凋亡/化学诱导 视黄酸受体 RAR $\beta$  乳腺癌细胞

**中图分类号** Q753, Q228

## Induction of apoptosis by all- trans retinoic acid in cancer cells

Wu Qiao Zeng Yun Zhang Xiao Kun

*The State Laboratory for Tumor Cell Engineering in Xiamen University Xiamen, Fujian, 361005*

**Abstract Objective:** To explore the effect mechanism of all-trans retinoic acid (ATRA) on induction of apoptosis and the growth inhibition in human breast cancer cell lines. **Methods:** Apoptosis, growth inhibition and mRNA level in breast cancer cell lines were detected by fluorescent microscopy, flow cytometry, MTT assay and northern blot. **Results:** 1) ATRA can induce apoptosis of ZR-75-1 breast cancer cells, but it can not induce apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. 2) ATRA can inhibit the growth of ZR-75-1 breast cancer cells effectively, whereas it has no effect on MDA-MB-231 breast cancer cells. 3) ATRA can induce RAR $\beta$  expression in ZR-75-1 breast cancer cells, but it can not induce RAR $\beta$  expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Conclusions:** Induction of apoptosis may contribute to the growth inhibitory effect of ATRA in ZR-75-1 breast cancer cells. The expression of RAR $\beta$  is an important factor which may mediate apoptosis induced by ATRA and growth inhibitory effect of ATRA.

**Key words** All- trans retinoic acid Apoptosis RAR $\beta$  Breast cancer cell lines

细胞凋亡不仅对胚胎发生、器官发育及保持机体自稳等至关重要, 而且对细胞增殖、肿瘤发生、预防和治疗也十分重要<sup>[1]</sup>。研究已证实, 全反式视黄酸(all- trans retinoic acid, ATRA)能够抑制许多类型癌细胞的生长, 具有显著抗肿瘤作用<sup>[2,3]</sup>。视黄酸的作用主要由其受体——RAR(retinoic acid receptor)和RXR(retinoid X receptor)介导<sup>[4]</sup>, 受体表达水平改变可能引起细胞凋亡的抑制, 导致细胞增殖异常和肿

瘤加速形成<sup>[5]</sup>。本文研究ATRA诱导乳腺癌细胞的细胞凋亡, 通过对视黄酸受体RAR $\alpha$ 和RAR $\beta$  mRNA表达水平的分析, 试图阐明受体表达水平与细胞凋亡和细胞生长之间的相互关系, 探讨ATRA的诱导调节机制, 为临床治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

乳腺癌ZR-75-1和MDA-MB-231细胞分别培养在RPMI-1640和DMEM培养液中, 培养液含10%胎牛血清和青霉素(100单位/ml)、链霉素(100  $\mu$ g/ml)。细胞株来自ATCC (American Type Culture Collection)。

福建省自然科学基金资助项目, C96002

作者单位: 1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(福建, 361005)

2. 美国, 加州La Jolla癌症研究中心

第一作者: 女, 1959年5月出生, 副研究员, 博士

1.2 荧光显微镜观察细胞凋亡形态

细胞经 ATRA ( $10^{-6}$  mol/L Sigma) 处理 3 天, 胰蛋白酶消化, 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗涤, 3.7% 多聚甲醛固定 1 hr, 荧光染料 DAPI (4, 6- Diamidino- 2- phenylindole, 0.1  $\mu$ g/ml) 避光染色 1 hr, 最后将细胞涂片, 在荧光显微镜下观察。在同一张片上随机计算 1000 个细胞, 统计发生细胞凋亡的细胞数量。

1.3 流式细胞术定量分析细胞凋亡

细胞经 ATRA( $10^{-6}$  mol/L) 处理 4 天, 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤, 3.7% 多聚甲醛固定 1 hr, 采用 TdT (terminal deoxyribonucleotidyl transferase) 方法标记细胞 (按产品说明书操作, Boehringer, Mannheim, Germany)。即: 通过末端转移酶将生物素- 16- dUTP 标记到细胞, 再用含抗生物素蛋白的异硫氰酸盐染色细胞, 最后在流式细胞仪上自动作图分析。

1.4 RNA 制备和 RNA 印迹

参照文献[6]方法进行。细胞经 ATRA( $10^{-6}$  mol/L) 处理 24 hr。用硫氰酸胍提取和氯化铯离心制备总 RNA, 取 30  $\mu$ g RNA 在含甲醛的凝胶上电泳后, 将 RNA 转移到尼龙膜上。以<sup>32</sup>P-  $\alpha$ - dATP 和<sup>32</sup>P-  $\alpha$ - dCTP 标记 RAR $\alpha$  和 RAR $\beta$  cDNA 制备探针, 与尼龙膜上的 RNA 杂交, 洗膜, - 80 $^{\circ}$ C 放射自显影。为确定所用的 RNA 量, 在同一张膜上再进行  $\beta$ - actin DNA 杂交。

1.5 细胞生长测定(MTT 测定)

细胞以 1000 个细胞/ 孔的接种量接种于 96 孔培养板, 用不同浓度的 ATRA( $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  mol/L) 连续处理 9 天, 其中每隔 3 天更换新鲜培养液并加入 ATRA, 以 MIT (3- [4, 5- Dimethylthiazol- 2- yl] - 2, 5- diphenyltetrazolium bromide) 染色法( 按产品说明书操作, Promega) 测定。即: 在细胞液中加入 15  $\mu$ l MIT, 细胞被染色后, 以 100  $\mu$ l 的二甲基亚砷( DMSO) 溶解染料, 当溶液中的四唑盐转变为蓝色的甲臢产物时, 于酶标仪上测定吸光值( 550 nm)。实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 ATRA 对细胞凋亡形态变化的影响

ZR- 75- 1 细胞经 ATRA 诱导后发生细胞凋亡时, 细胞核变小, 染色体固缩, 并断裂成许多小片段, 形成致密小体, 被 DAPI 染色后, 在荧光显微镜下呈发亮小体( 图 1), 未发生细胞凋亡的细胞, 则看不见发亮小体, 因此细胞核的形态与对照组( 图 2) 类似,

表明 ATRA 能够诱导 ZR- 75- 1 乳腺癌细胞发生细胞凋亡的形态变化。



图 1 荧光显微术观察 ATRA 诱导的 ZR- 75- 1 乳腺癌细胞的细胞凋亡(实验组,  $\times 1000$ )



图 2 荧光显微术观察 ZR- 75- 1 乳腺癌细胞的细胞核(对照组,  $\times 1000$ )

统计结果表明, ATRA 能够有效地诱导 ZR- 75- 1 细胞凋亡, 细胞凋亡率为 52%, 而 ATRA 则不能有效地诱导 MDA- MB- 231 细胞凋亡, 细胞凋亡率为 3.1%, 与对照组(诱导前) 比较, 无明显的诱导作用(表 1)。

表 1 ATRA 诱导乳腺癌细胞的细胞凋亡率

| 细胞株          | 诱导前(%) | 诱导后(%) |
|--------------|--------|--------|
| ZR- 75- 1    | 3.8    | 52.0   |
| MDA- MB- 231 | 2.7    | 3.1    |

2.2 ATRA 对细胞凋亡诱导的影响

为了进一步证实以上统计的结果, 我们用流式细胞仪测定细胞凋亡, 结果如图 3 所示, ATRA 能够显著诱导 ZR- 75- 1 细胞凋亡, 细胞凋亡率高达 57.6%; 而在 MDA- MB- 231 细胞中, ATRA 诱导细胞凋亡的能力显著下降, 细胞凋亡率仅为 3.6%, 与对照组一样, 表明 ATRA 对不同细胞的细胞凋亡的诱导能力有所不同。

2.3 ATRA 对视黄酸受体表达的影响

RNA( 30  $\mu$ g) 印迹检测视黄酸受体 mRNA 表达的结果显示, 在 ZR- 75- 1 细胞中 RAR  $\alpha$  表达, 经 ATRA 诱导后 RAR  $\alpha$  表达水平没有变化, 在 MDA- MB- 231 细胞中, RAR  $\alpha$  在 ATRA 诱导前后均不表达( 图 4)。对 RAR  $\beta$  表达的测定则表明, ATRA 能够有效地诱导 ZR- 75- 1 细胞的 RAR  $\beta$  表达, 但对

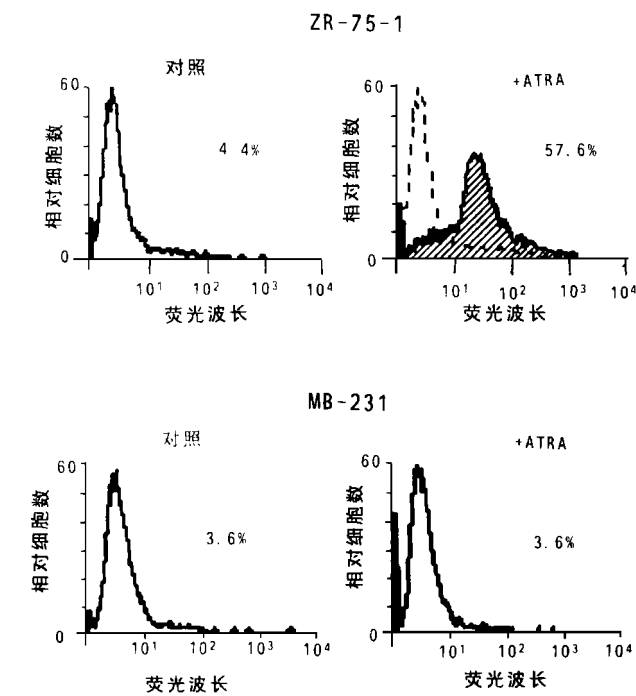


图 3 流式细胞术分析 ATRA 诱导 ZR- 75- 1 和 MDA- MB- 231 细胞凋亡



图 4 RNA 印迹检测 ATRA 对 RARα 表达的影响

MDA- MB- 231 细胞的 RARβ 表达则无诱导作用 (图 5), 表明 ATRA 对不同细胞的视黄酸受体表达的诱导能力有所不同。

2.4 ATRA 对癌细胞生长抑制的影响

MIT 测定表明, ATRA 能够有效地抑制 ZR- 75- 1 细胞生长, 当细胞处理到第 9 天时, ATRA (10<sup>-6</sup> mol/ L) 对 ZR- 75- 1 细胞生长抑制率达到 60%, 但对 MB- 231 细胞生长则无显著的抑制作用 (图 6), 表明 ATRA 对不同癌细胞生长的抑制能力有所不同。

3 讨论

细胞凋亡形态观察 (图 1), 统计结果 (表 1) 和流



图 5 RNA 印迹检测 ATRA 对 RARβ 表达的影响

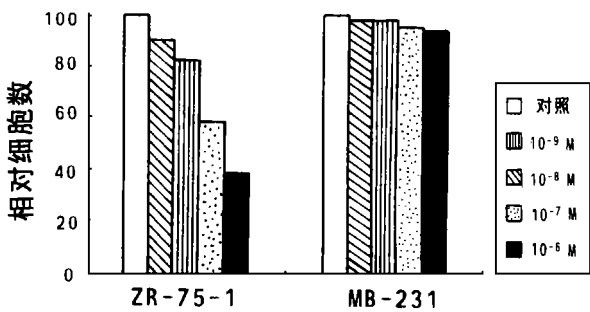


图 6 ATRA 对 ZR- 75- 1 和 MB- 231 细胞的生长抑制

式细胞术测定结果 (图 3) 都一致表明, ATRA 能够显著诱导乳腺癌 ZR- 75- 1 细胞凋亡, 但对 MDA- MB- 231 细胞没有诱导作用, 提示视黄酸诱导细胞凋亡的机制可能与细胞生长和分化的不同方式有关, 也可能与细胞类型有关, 因为 ZR- 75- 1 细胞是早期的、恶性程度较低的癌细胞, MDA- MB- 231 细胞则是攻击性较强、恶性程度高的晚期癌细胞, 而且临床治疗已表明, 全反式视黄酸及其合成的衍生物对一些晚期实体瘤的治疗效果较差, 甚至无作用<sup>[7,8]</sup>。

视黄酸诱导细胞凋亡的机理至今仍未阐明。文献报道, 4- HPR ([N- (4- hydroxy- phenyl)] retinamide) 通过诱导细胞凋亡来抑制髓样细胞、淋巴样细胞和成神经细胞瘤的恶性生长<sup>[9,10]</sup>。视黄酸的作用主要由其受体 RARs 和 RXRs 介导, 这些受体中, RAR β 在扩增视黄酸的应答起着关键作用<sup>[11]</sup>。许多证据表明, RAR β 功能改变可能与癌症发生和发展有关<sup>[6]</sup>, 目前在许多不同癌细胞中已检测到 RAR β 基因的异常表达。也有文献表明 RAR β 能够在肺癌和乳腺癌细胞中发挥肿瘤抑制因子的作用<sup>[12]</sup>。本文结果 (图 4, 5) 也清楚表明, RAR β 在这两种癌细胞中均不表达, 但经 ATRA 诱导后在 ZR- 75- 1 细胞中表达, 而在 MDA- MB- 231 细胞中仍不表达。由此提示 RAR β 的表达可能在视黄酸抑制乳腺癌细胞生长过程中发挥关键作用。进一步测定细胞生长

率, ATRA 能够有效抑制 ZR- 75- 1 细胞生长, 而对 MDA- MB- 231 细胞生长则没有抑制作用 (图 6)。这一结果与细胞凋亡诱导的结果相吻合, 表明 RAR  $\beta$  可能是介导 ATRA 诱导细胞凋亡和抑制癌细胞生长过程中的一个重要因子。在诱导过程中我们还观察到, ATRA 诱导细胞两天后即发生细胞凋亡, 而对癌细胞生长抑制则发生较晚。这些结果表明, ATRA 对癌细胞生长抑制与其诱导细胞凋亡密切相关, 而细胞凋亡和生长抑制可能是 ATRA 对 RAR  $\beta$  诱导和调控的结果, 由此限制细胞增殖速率。细胞凋亡过程是受基因 (如 bcl- 2, myc 和 p53 等) 调控, Delia 等人观察到, 在分化过程中, bcl- 2 表达水平在 HL- 60 细胞中明显下降, 而 RAR  $\beta$  转录水平则上升<sup>[13]</sup>。所以 RAR  $\beta$  可能作为抑制因子来调节那些影响细胞凋亡的基因表达, 从而介导 ATRA 诱导的细胞凋亡过程, 如果 RAR  $\beta$  不表达, 则可能失去这种调节机制, 由此导致 ATRA 对癌细胞生长丧失抑制作用。可见 RAR  $\beta$  介导的 ATRA 信号传导在诱导细胞凋亡和抑制细胞生长过程中的重要作用。

### 参 考 文 献

- 1 栗 俭综述. 药物诱导的肿瘤细胞凋亡研究进展. 国外医学(肿瘤学分册), 1995, 22: 7
- 2 Castaigne S, Chomienne C, Daniel M T, et al. All- trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia I clinical results. *Blood*, 1990, 76: 1704
- 3 Lippman S. M, Kessler J. F, Meyskens F. L. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat. Rep.*, 1987, 71: 493
- 4 Zhang X- K, Pfahl M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1993, 4: 156
- 5 Zhang L- X, Mills K. J, Dawson M. I, et al. Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR  $\alpha$  dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 6022
- 6 J 萨姆布鲁克等著, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南, 第一版, 北京: 科学出版社, 1993: 352
- 7 Cassidy J, Lippman M, LaCroix A, et al. Trial of 13- cis- retinoic acid in metastatic breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1982, 18: 925
- 8 Modiano M, Dalton W, Lippman S, et al. Study of fenretinide (n- [4- hydroxyphenyl] retinamide) in advanced breast cancer and melanoma. *Invest. New Drugs*, 1990, 8: 317
- 9 Mirco P, Bocca P, Chiesa V, et al. Differential effects of N- (4- hydroxyphenyl) retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res.*, 1995, 55: 853
- 10 Domenico D, Aiello A, Lombardi L, et al. N- (4- hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res.*, 1993, 53: 6036
- 11 Houle B, Ledue F, Bradley W. E. C. Implication of RAR  $\beta$  in epidermoid (squamous) carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 1991, 195: 163
- 12 Houle B, Rochette E. C, Bradley W. E. C. Tumor- suppressive effect of the retinoic acid receptor  $\beta$  in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Acad. Sci USA*, 1993, 90: 985
- 13 Delia D, Aiello A, Soligno D, et al. Bcl- 2 proto- oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood*, 1992, 79: 1291

(收稿: 1997- 05- 17 修回: 1997- 11- 04)

## • 会议信息 •

### 第七届全国鼻咽癌学术会议今年十一月在广州召开

中国抗癌协会鼻咽专业委员会、中山医科大学肿瘤防治中心主办的第七届全国鼻咽癌学术会议将于今年十一月在广州召开。大会将邀请国内及美、英、法、瑞典等国及港、台地区专家作专题报告, 内容丰富, 拟报告专题有:

1. 鼻咽癌的去、现在与将来 (闵华庆教授); 2. 鼻咽癌分子生物学的研究进展 (姚开泰院士); 3. 国内放射治疗的发展与问题 (殷蔚伯教授); 4. 鼻咽癌的放射治疗 (刘泰福教授); 5. 鼻咽癌与 EBV (曾毅院士); 6. 鼻咽癌相关基因的研究现状 (曾益新教授); 7. 鼻咽癌国内、外分期介绍 (蔡伟明教授); 8. 鼻咽癌非常规分割放疗 (何少琴教授); 9. 基因的表达与调控 (李桂源教授); 10. 颈部淋巴结的放射治疗 (张有望教授); 11. X 刀的临床应用 (江建开主任); 12. 高剂量后装 (潘建基主任); 13. 鼻咽癌的浸润与转移机制 (黄光武教授); 14. 鼻咽癌的最优筛查方案 (黄腾波教授); 15. EBV 相关基因 (汪慧民教授); 16. 鼻咽癌外照射的有关建议 (崔念基主任); 17. 鼻咽癌的预后与分层综合治疗 (洪明晃副教授); 18. 鼻咽癌的手术治疗 (郭翔副主任); 19. 鼻咽癌残留与复发灶的立体定向放射治疗 (肖建平副教授); 20. 以三维 TPS 探讨鼻咽癌合理照射方案等 (高黎副教授); 21. 鼻咽癌咽旁间隙受侵与预后的关系 (肖光莉副教授)。

欢迎国内外专家学者踊跃参加。

《癌症》编辑部